

DE19802905

Publication Title:

Selective one strand enzymatic replication of double-stranded genetic material, used for detection of specific sequences, e.g. fingerprinting

Abstract:

Abstract of DE19802905

Selective enzymatic replication of double-stranded genetic material (of the type produced by polymerase chain reaction, PCR, for DNA samples) is new. Selective enzymatic replication of double-stranded genetic material (of the type produced by polymerase chain reaction, PCR, for DNA samples) is new, and comprises: (i) exponential amplification of selected portions of the both strands using a pair of first primers (P1); (ii) adding an unpaired second primer (P2) that can hybridize to only one of the two DNA segments amplified, at a concentration significantly higher than that of P1, and (iii) continuing amplification cycles such that only linear amplification of the strand selected by P2 occurs. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>



⑱ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 02 905 A 1**

⑤① Int. Cl.⁶:
C 12 P 19/34
G 01 N 27/62
C 12 Q 1/68

⑳ Aktenzeichen: 198 02 905.5
㉔ Anmeldetag: 27. 1. 98
㉓ Offenlegungstag: 29. 7. 99

DE 198 02 905 A 1

㉑ Anmelder:
Bruker Daltonik GmbH, 28359 Bremen, DE

㉒ Erfinder:
Erfinder wird später genannt werden

㉕ Entgegenhaltungen:
US 55 67 583
WO 97 33 000 A1
WO 96 40 972 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur bevorzugten Herstellung nur eines Stranges selektierten Genmaterials für massenspektrometrische Messungen

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung und selektiven, enzymatischen Vervielfältigung von Genmaterial, beispielsweise von Desoxy-Ribo-Nukleinsäure (DNA) aus Biomaterial durch PCR (polymerase chain reaction), für die massenspektrometrische Analyse zur Feststellung bestimmter genetischer Merkmale im Biomaterial, vorzugsweise in Flugzeitmassenspektrometern (TOF) mit matrixunterstützter Laser-Desorption und -Ionisierung (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, nur einen Strang eines Abschnitts des doppelsträngigen Genmaterials in einem enzymatischen Verfahren bevorzugt zu vervielfältigen, indem in herkömmlicher Art mit einem Erst-Primerpaar genügend viele Zyklen mit exponentieller Vervielfältigung beider Stränge durchlaufen werden, wonach durch Zugabe eines einzigen Zweit-Primers in hohem Überschuß in weiteren Zyklen im wesentlichen eine lineare Vervielfältigung des durch den Zweit-Primer ausgewählten Einzelstrangs vorgenommen wird. Der Zweit-Primer kann, muß aber nicht mit einem der Erst-Primer identisch sein. Die Erst-Primer können dabei durch weitere Zugaben blockiert werden.

DE 198 02 905 A 1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Aufbereitung und selektiven, enzymatischen Vervielfältigung von Genmaterial, beispielsweise von Desoxy-Ribo-Nukleinsäure (DNA) aus Biomaterial durch PCR (polymerase chain reaction), für die massenspektrometrische Analyse zur Feststellung bestimmter genetischer Merkmale im Biomaterial, vorzugsweise in Flugzeitmassenspektrometern (TOF) mit matrixunterstützter Laser-Desorption und -Ionisierung (MALDI).

Die Erfindung besteht darin, nur einen Strang eines Abschnitts des doppelsträngigen Genmaterials in einem enzymatischen Verfahren bevorzugt zu vervielfältigen, indem in herkömmlicher Art mit einem Erst-Primerpaar genügend viele Zyklen mit exponentieller Vervielfältigung beider Stränge durchlaufen werden, wonach durch Zugabe eines einzigen Zweit-Primers in hohem Überschuß in weiteren Zyklen im wesentlichen eine lineare Vervielfältigung des durch den Zweit-Primer ausgewählten Einzelstrangs vorgenommen wird. Der Zweit-Primer kann, muß aber nicht mit einem der Erst-Primer identisch sein. Die Erst-Primer können dabei durch weitere Zugaben blockiert werden.

Stand der Technik

Das "genetische Fingerabdruckverfahren" ("DNA fingerprinting" oder "DNA typing") revolutioniert zur Zeit die individuelle Identifizierung und die Charakterisierung der Erbanlagen (einschließlich der Anlagen zu Krankheiten) von Menschen, Tieren und Pflanzen. Es beruht letztendlich auf der Molekulargewichtsbestimmung selektiv vervielfältigter, hochvariabler DNA-Segmente ("hypervariable DNA regions", "polymorphic DNA segments"), beispielsweise sogenannter Mikrosatelliten (oder auch STR genannt = short tandem repeats), die aus einer variierenden Zahl von Wiederholungen einer kleinen Sequenz von zwei bis fünf Nukleotiden bestehen, aber auch anderer polymorpher Formen, wie zum Beispiel die der 2-alleligen Polymorphismen, die auf Punktmutationen beruhen. Die Messung der Molekulargewichte geschieht zur Zeit noch durch das langsame und nicht voll automatisierbare Verfahren der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (abgekürzt PAGE). Alle diese Arten der Genotypisierung können aber wesentlich besser und genauer durch massenspektrometrische Messungen der Molekulargewichte angegangen werden, wobei für die letztere Art der Polymorphismen besondere Arten der Probenvorbereitung (beispielsweise mit einem mutationsabhängigen Zerschneiden der DNA oder mit einer sogenannten Primer-Extension unter Weglassen einer der vier Triphosphatnukleotide in der PCR-Reaktionslösung) erforderlich sind.

Die Medizin kennt heute weit über 6000 monogene Krankheiten, die auf solche mutierten Veränderungen einzelner Gene zurückzuführen sind, die noch weiter verbreiteten polygenen Krankheiten sind noch weitgehend unerforscht. Es steht zu erwarten, daß wir in fünf Jahren alle Gene kennen, in zehn Jahren alle Mutationen. Es sind heute für den Menschen bereits etwa 10000 Mikrosatelliten bekannt, es ist zu erwarten, daß es mehr als zehnmals so viele gibt.

Die DNA besteht bekanntlich aus zwei komplementären Ketten von vier sich abwechselnden Nukleotiden, deren Reihenfolge den genetischen Code bilden. Die Nukleotide bestehen jeweils aus einem Zucker (Ribose), einer Phosphorsäuregruppe und einer Base. Je zwei Basen sind zueinander komplementär. Zucker und Phosphorsäure bilden die fortlaufende Kette der DNA (oder das sogenannte Rückgrat), die vier charakteristischen Basen sind jeweils seitliche Abzweigungen; sie sind n-glycosidisch an der Zucker-

gruppe befestigt. Die beiden komplementären Ketten der DNA sind in Form einer Doppelhelix angeordnet, wobei jeweils zwei komplementäre Nukleotide über zwei oder drei Wasserstoffbrücken zwischen den Basen miteinander verbunden sind.

Grundlage des Fingerprint-Analysenverfahren ist die selektiv arbeitende PCR ("polymerase chain reaction"), eine einfache Vervielfältigungsmethode für gezielt aussuchbare DNA-Stücke im Reagenzglas, die erst 1983 von K. B. Mullis (dafür Nobelpreis 1993) entwickelt wurde und nach der Einführung temperaturstabiler Polymerasen einen beispiellosen Siegeszug durch die genetischen Laboratorien angetreten hat.

Ähnliche enzymatische Amplifikationsverfahren (in-vitro-Transkription) gibt es heute auch für die RNA (Ribo-Nukleinsäure).

Die heute durch diese Verfahren ausführbar gewordenen gelelektrophoretischen Analysen geringster Anfangsmengen von DNA werden in sogenannten Sequenzern auf Basis des oben erwähnten PAGE-Verfahrens durchgeführt. Dieser Art von Analyse wird jedoch von Fachleuten keine Zukunft vorhergesagt, da sie sich durch häufig auftretende, verschiedenartige Artefakte einer oft versuchten Automatisierung immer wieder entzieht und daher sehr personalaufwendig ist. Außerdem ist sie langsam und durch einen relativ hohen Verbrauch an Reagenzien auch recht teuer. Dieses Verfahren war eine Pioniermethode, erweist sich aber zunehmend als Engpaß für die weitere Verbreiterung der Methode.

Ein vielversprechendes Verfahren ist die Kapillarelektrophorese mit einer Vielzahl von Kapillaren, das gerade in einer ersten kommerziellen Version auf den Markt kommt. Bislang waren solche Geräte mit nur einer einzigen Kapillare erhältlich.

Es ist zu erwarten, daß massenspektrometrische Messungen des Molekulargewichts mit weit höheren Geschwindigkeiten und höherer Zuverlässigkeit möglich sein werden als die Bestimmung der Mobilität mit der Gelelektrophorese oder Kapillarelektrophorese. Der gegenwärtig rasche Fortschritt in der MALDI-Technik führt zu hohem Automatisierungsgrad der Probenionisierung und zu kurzen Analysenzeiten pro Probe. Es werden damit Molekulargewichtsbestimmungen auch sehr großer Analytmoleküle in Mengen von einigen hundert Attomol in Meßdauern von wenigen Sekunden möglich. Auf einem Probenträger können viele Tausende von Proben untergebracht werden. Die Automatisierung und die hohe Dichte an Proben eröffnen mit der massenspektrometrischen Analyse die Möglichkeit zu einer massiv-parallelen Verarbeitung von einigen zehntausend Proben pro Tag.

MALDI (matrixunterstützte Laserdesorption und Ionisierung) ist ein Ionisationsverfahren für großmolekulare Analytsubstanzen auf Oberflächen. Die Analytsubstanzen werden zusammen mit geeigneten Matrixsubstanzen eines relativ zu den Analytmolekülen kleinen Molekulargewichts in Lösung auf eine Oberfläche gebracht, dort eingetrocknet und mit einem Laserpuls von wenigen Nanosekunden Dauer bestrahlt. Es verdampft eine geringe Menge an Matrixsubstanz, einige Moleküle davon als Ionen. Die in der Matrix sehr verdünnte Analytsubstanz, deren Moleküle in der Verdünnung vereinzelt sind, wird dabei mit verdampft, auch wenn ihr Dampfdruck normalerweise für eine Verdampfung nicht ausreicht. Die relativ kleinen Ionen der Matrixsubstanz reagieren mit den großen Molekülen der Analytsubstanz mit der Folge, daß die Analytsubstanzmoleküle durch Protonenübergang als Ionen zurückbleiben. Doppelsträngige DNA (dsDNA) wird dabei in der sauren Matrix zu einsträngiger DNA (ssDNA) reduziert.

Massenspektrometer mit MALDI- oder ESI-Technik (ESI = Elektrosprüh-Ionisierung) werden bereits für die Sequen-

zierung der DNA nach dem Sanger-Schema unter Benutzung von PCR-Verfahren eingesetzt, siehe dazu PCT/US 94/00193.

Einen Überblick über den Stand massenspektrometrischer DNA-Analysen gibt der Artikel "Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified DNA Products by Mass Spectrometry Using Matrix-Assisted Laser Desorption and Electrospray: Current Status" by M. J. Doktycz et al., *Analytical Biochemistry* 230, 205-214 (1995).

PCR ist die gezielte Vervielfältigung eines genau ausgesuchten Stückes der zweisträngigen DNA. Die Auswahl des DNA-Segments erfolgt durch ein Paar von sogenannten Primern, zweier ssDNA-Stücke mit je etwa 20 Basen Länge, die (etwas verkürzt und vereinfacht beschrieben) an beiden Seiten (den zukünftigen Enden) des ausgesuchten DNA-Stückes hybridisieren. Die Vervielfältigung erfolgt durch ein Enzym namens Polymerase, das eine chemische Fabrik in einem Molekül darstellt, in einem einfachen Temperaturzyklus. Die PCR-Reaktion läuft in wäßriger Lösung ab, in der wenige Moleküle der Ausgangs-DNA und genügende Mengen an Polymerase, Primern, Nukleinsäuren und Stabilisatoren vorhanden sind. In jedem Temperaturzyklus (beispielsweise Aufschmelzen der Doppelhelix bei 92°C, Hybridisieren der Primer bei 55°C, Wiedervervollständigung zu einer Doppelhelix durch Anbau neuer DNA-Glieder durch die Polymerase bei 72°C) wird das ausgewählte DNA-Segment im Prinzip verdoppelt. In 30 Zyklen werden also aus einem einzigen Doppelstrang der DNA als Ausgangsmaterial rund eine Milliarde DNA-Segmente erzeugt (In strenger Beschreibung hybridisieren die beiden Primer auf den beiden verschiedenen Einzelsträngen der DNA und die Verkürzung auf das ausgewählte DNA-Segment von einem Primer zum anderen tritt erst statistisch bei weiterem Vervielfachen auf).

Die Polymerase kann unter optimalen Bedingungen etwa 500 bis 1000 Basen pro Sekunde an den Primer anbauen. Bei genügendem Überschuß an Primern, Polymerase und Substraten hängt die Zykluszeit praktisch nur von der Aufheiz- und Abkühlgeschwindigkeit ab, die wiederum vom Flüssigkeitsvolumen, Gefäßvolumen, Wärmeleitfähigkeit u. a. abhängt. Auf jeder Temperaturstufe sind im Prinzip nur wenige Sekunden vonnöten.

Die Primer werden Teil der vervielfältigten DNA-Segmente, sie verbrauchen sich auf diese Weise während der PCR-Vervielfältigung. Andererseits ist das von Vorteil: an den künstlich hergestellten Primern lassen sich beispielsweise chemische Gruppen anbauen, die für die spätere Detektion benutzt werden können (wie etwa fluoreszierende oder besonders gut ionisierende Gruppen).

Durch die Zugabe nur eines Primerpaares lassen sich uniforme DNA-Segmente vervielfachen. Werden andererseits gleichzeitig mehrere verschiedenartige Primerpaare zugegeben, so werden auch gleichzeitig mehrere uniforme DNA-Segmente vervielfältigt ("multiplexed PCR"). Diese Art der Multiplex-PCR wird häufig angewandt und hat oft besondere Vorteile. Für das sogenannte "Fingerprinting" zur Identifizierung von Individuen durch DNA-Segmente variabler Länge (Methoden der "VNTR = Variable Number of Tandem Repeats" oder "AMP-FLP = Amplified Fragment Length Polymorphism") macht es die Analysen schneller. Dabei kann durch die Wahl der Primer, deren Abstand das mittlere Molekulargewicht der DNA-Segmente bestimmt, erreicht werden, daß die Variationen der Molekulargewichte der durch die verschiedenen Primerpaare gebildeten DNA-Segmente sich nicht oder nur selten überlappen. Diese Art der Multiplex-PCR bedingt einen Analysator, der zur gleichzeitigen Messung eines großen Bereichs der Molekulargewichte fähig ist.

Besondere Vorteile hat das Verfahren beispielsweise zur Identifizierung von infektiösen Lebewesen, da gleichzeitig bis zu 20 Bakteriensorten (oder Viren, Hefen, Pilze) mit einer einzigen PCR-Vervielfältigung nachgewiesen werden können.

Die Massenspektrometrie als Meßmethode für die Größe der vervielfältigten DNA-Segmente hat beträchtliche Vorteile: es wird nicht die Ionenmobilität in Flüssigkeit oder polymerisiertem Gel gemessen, sondern direkt die Masse der Ionen. Die Ionenmobilität hängt in kritischer Weise von Formfaktoren ab und es kann daher vorkommen, daß die (manchmal zufällig angenommene) Faltungsstruktur der Moleküle eine Verfälschung der Messungen ergibt. Aber auch der (manchmal zufällig abweichende) Polymerisierungsgrad des Gels beeinflusst die Wanderungsgeschwindigkeit der DNA-Segmente, so daß es häufig zu Artefakten kommt.

Mit diesen Arten von Artefakten ist in der Massenspektrometrie nicht zu rechnen. Die Massenspektrometrie bietet darüberhinaus prinzipiell eine höhere Genauigkeit der Massenbestimmung. Aber auch die massenspektrometrische Messung der Massen der DNA-Segmente unterliegt Einschränkungen. Die Messung der DNA allgemein und insbesondere die Genauigkeit der Massenbestimmung ist besonders durch drei Effekte beeinflusst: (1) Adduktbildung durch ubiquitäre Na- oder K-Ionen, die sich in zufälligen Mengen an die DNA-Segmente anlagern, (2) die Bildung von Doppelpeaks durch verschiedene Massen der beiden DNA-Einzelstränge und (3) die Fragmentierung der zu messenden ssDNA-Segmente während des MALDI-Prozesses, meist durch Abspalten der Basen während der Ionisierung. Alle drei Effekte führen zu einer Verschmierung der Peaks: Adduktbildung zu höheren Massen hin, Fragmentierung zu niedrigeren Massen, und die Doppelpeakbildung zu einer oft nicht mehr als Doppelpeak erkennbaren Verbreiterung. Im hohen Massenbereich wirken diese Effekte so, daß nicht mehr auf ein Nukleotid genau gemessen werden kann. Die massenspektrometrische DNA-Analyse ist daher heute auf Längen der DNA von etwa 40 bis 60 Basen beschränkt, wenn nicht besondere Maßnahmen zur Verbesserung der Messungen ergriffen werden.

Für die Massenspektrometrie ist es aber auch aus Gründen der Massenbestimmungsgenauigkeit wesentlich, mit möglichst geringen Molekulargewichten zu arbeiten, also möglichst nur mit Einzelsträngen der DNA. Beim MALDI-Verfahren werden glücklicherweise automatisch nur Einzelstränge gemessen: entweder werden durch das Zugeben der in der Regel sehr saure Matrixlösung die verbliebenen DNA-Doppelstränge (oder durch Anlagerung von Primern entstandenen Teil-Doppelstränge) praktisch vollständig getrennt, oder die Trennung erfolgt im MALDI-Prozeß selbst. Dadurch aber gibt es das erwähnte Problem der Doppelpeaks.

Im PCT-Patent PCT/GB 96/00476 (WO 96/27681) ist eine Methode beschrieben, wie man DNA-Analoga herstellen kann, die für den MALDI-Prozeß wesentlich besser geeignet sind. Es lassen sich für die MALDI-Massenspektrometrie in die Primer elektrisch geladene Gruppen einbauen, die den MALDI-Prozeß der Ionisierung so unterstützen, daß eine sehr hohe Ionenausbeute und damit eine hohe Empfindlichkeit erreicht wird. Andererseits lassen sich die negativen Gruppen des DNA-Rückgrats neutralisieren, was sowohl für eine bessere Stabilität sorgt, als auch besonders die Adduktbildung unterdrückt.

Diese Methode läßt sich besonders gut und fehlerfrei nur ausführen, wenn eine Zweischritt-PCR angewandt wird, wobei nach anfänglich herkömmlicher PCR-Vervielfältigung ein Schritt folgt, in dem modifizierte Primer und modi-

fizierte Substrate (Triphosphatnukleotide) eingesetzt werden. Dabei wird gleichzeitig auch die Selektion eines einzigen DNA-Stranges vorgenommen. Das erfordert aber zwischen den beiden Schritten eine zwischenzeitliche Bindung der DNA an eine Oberfläche, um die PCR-Reaktionslösung auswaschen und durch eine neue ersetzen zu können. Diese Methode liefert dabei automatisch nur einen der beiden Stränge der DNA; sie erfordert aber einen besonderen Aufwand, und läßt sich zudem nicht einfach in herkömmlichen Pipettierrobotern automatisieren.

Andererseits gibt es alternative Methoden zur Unterdrückung der Adduktbildung durch besondere Methoden der automatischen Aufreinigung der vervielfältigten Produkte (beispielsweise automatisierte Reinigung von allen Salzen in Pipettenspitzen von Pipettierrobotern), und besondere Präparationsmethoden der MALDI-Trägerplatten zur Unterdrückung der Adduktbildung.

Für die Stabilisierung der ssDNA gegen Verlust der Basen sind auch bereits Maßnahmen bekannt, wie beispielsweise die Verwendung von Deaza-Nukleotidtriphosphaten.

Damit bleibt häufig die Bildung der Doppelpeaks durch die beiden Stränge der DNA das störendste Element der massenspektrometrischen DNA-Analyse in bezug auf eine präzise Massenbestimmung. Die Nukleotide der DNA besitzen unterschiedliche Massen, die Massendifferenzen zwischen den vier Nukleotiden betragen jeweils 9 bis 20 atomaren Masseneinheiten. Die statistische Verteilung der vier Nukleotide auf die beiden Einzelstränge bewirkt, daß die beiden Einzelstränge in aller Regel unterschiedliche Massen aufweisen. Nur in extrem seltenen Fällen sind beide Einzelstränge genau gleich schwer.

Für die massenspektrometrische Analyse ist es daher hinderlich, daß bei der DNA-Vervielfältigung durch die PCR immer beide Einzelstränge der DNA im gleichen Maße erzeugt werden. Es entsteht im Massenspektrum praktisch immer ein Doppelpeak, dessen Abstand zwischen beiden Peaks von Analysenaufgabe zu Analysenaufgabe schwankt. Wegen der zusätzlichen Verbreiterung beider Peaks durch die Isotopenverteilung ergibt sich ein Massenspektrum, das nicht sehr bequem auszuwerten ist. Es ist daher bei der Verwendung der Massenspektrometrie ein wünschenswertes Ziel, DNA-Analysen mit nur einem der beiden Einzelstränge ausführen zu können. Eine dieser Möglichkeiten ist in der bereits oben erwähnten Patentschrift WO 96/27681 angegeben, nachteilig ist dabei jedoch – wie ebenfalls erwähnt – der Zwang zur intermediären Befestigung der DNA-Segmente an einer Oberfläche, die den Arbeitseigenschaften der Pipettierroboter, die systeminhärent nur mit Flüssigkeiten arbeiten, entgegensteht.

In der Biochemie und der Molekulargenetik haben sich für die parallele (synchrone) Verarbeitung vieler Proben sogenannte Mikrotiterplatten durchgesetzt. Es gibt bereits heute kommerziell erhältliche Probenvorbereitungssysteme (Pipettierroboter), die mit Mikrotiterplatten arbeiten. Diese enthielten ursprünglich auf einer nutzbaren Fläche von 72 mal 108 Millimeter 96 kleine Reaktionsgefäße in einem 9-mm-Raster. Heute haben sich Platten der gleichen Größe mit 384 fest im Kunststoff eingelassenen Reaktionsgefäßen im 4,5-mm-Raster durchgesetzt. Platten mit 1536 Reaktionsgefäßen im 2,25-mm-Raster sind im Kommen, und noch viel höhere Dichten sind in Diskussion.

Die häufig "massiv-parallel" genannte Verarbeitung von Proben, beispielsweise in der molekularen Genetik, besteht nun einerseits darin, nicht nur mit einer einzigen solchen Mikrotiterplatte zu arbeiten, sondern mit einer großen Anzahl solcher Platten parallel. Beispielsweise können bei gleichzeitiger Behandlung von 120 solcher 384er-Platten in einer einzigen PCR-Apparatur mehr als 46 000 DNA-Pro-

ben gleichzeitig in einer Zeit von etwa 3 Stunden jeweils milliardenfach vervielfältigt werden. Kommerziell erhältlich sind PCR-Automaten, die mit vier Mikrotiterplatten parallel arbeiten und die 30 PCR-Zyklen in weniger als drei Stunden abarbeiten. Sie lassen sich einfach in Pipettierroboter integrieren. Beim Übergang zu bereits erhältlichen 1536er-Platten würden sich im rund-um-die-Uhr-Betrieb rund 50 000 Proben täglich verarbeiten lassen.

Andererseits ist zu erwarten, daß sich die PCR-Zeit für eine Vermilliardenfachung mit miniaturisierten Reaktionssystemen in naher Zukunft auf weniger als 10 Minuten reduzieren wird, wobei sich durch die Verkleinerung der Reaktionssysteme auf wenige Mikroliter Inhalt mehr als Tausend solcher Reaktionssysteme auf der Fläche einer heutigen Mikrotiterplatte unterbringen lassen. Die Einführung der Mikrosystemtechnik kann zu weiterer Verkleinerung führen. Die synchrone Übertragung aller Proben aus diesen Mikroreaktoren auf MALDI-Trägerplatten wird folgen.

Aufgabe der Erfindung

Es ist die Aufgabe der Erfindung, ein möglichst einfach und in kommerziell hergestellten Pipettierrobotern automatisiert durchführbares Verfahren zur Amplifikation von zweisträngigem Genmaterial zu finden, mit dem sich ausreichende Mengen fehlerfrei amplifizierter Segmente nur eines Stranges des Genmaterials für die massenspektrometrische Analyse herstellen lassen. Das Verfahren soll in einfacher Weise in Mikrotiterplatten ausführbar sein, ohne daß in den Platten Oberflächenfixierung des Genmaterials und schlecht durchführbare Waschvorgänge erforderlich sind. Es sind weitere Aufgabe der Erfindung, die einsträngigen Segmente zu stabilisieren und mit einer eingebauten Ladung für einen hochempfindlichen Ionisierungsprozeß zu versehen.

Beschreibung der Erfindung

Die Erfindung wird hier am Beispiel der Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dargestellt, soll aber prinzipiell für alle enzymatisch gesteuerten Amplifikationsverfahren von Genmaterial gelten.

Es ist die Grundidee der Erfindung, zunächst eine Phase mit Zyklen einer exponentiellen PCR-Amplifikation der DNA-Segmente mit einem ersten Paar von Primern ("Erst-Primer") durchzuführen, dann durch Zugabe eines Zweit-Primers im großen Überschuß und durch Änderung der PCR-Bedingungen zu einer Phase mit Zyklen einer im wesentlichen linear verlaufenden PCR-Amplifikation überzugehen, in der im wesentlichen nur noch ein ausgesuchter Strang der DNA-Segmente weiter vervielfältigt wird. Diese lineare Amplifikation wird solange fortgesetzt, bis der selektierte Einzelstrang genügend Überschuß über den anderen Einzelstrang zeigt, um sich in der nachfolgenden massenspektrometrischen Spektrennahe (beispielsweise mit MALDI-Ionisierung) genügend herauszuheben. Dabei kann entweder mit nativen Nukleotidtriphosphaten, aber auch vorteilhafterweise bereits mit stabilisierenden Modifikationen wie Diaza-Verbindungen gearbeitet werden.

Dieses Verfahren hat den großen Vorteil, daß er sich in kommerziell hergestellten Pipettierautomaten bisheriger Konstruktion mit angeschlossenen PCR-Automaten vollkommen automatisch durchführen läßt. Es sind keine komplizierenden Vorgänge wie Oberflächenfixierung und Waschen, die den Arbeitseigenschaften der Pipettierroboter entgegenstehen, erforderlich. Der PCR-Automat wird allerdings zweimal in Anspruch genommen, einmal für die exponentielle Amplifizierung und einmal für die lineare.

Der im Überschuß zugegebene Zweit-Primer kann einer

der Erst-Primer des ursprünglichen Erst-Primerpaares sein, aber auch ein neuer Zweit-Primer, dessen Ansatzpunkt zum Inneren des DNA-Segmentes hin verschoben ist ("nested primer"). Dadurch wird das linear zu amplifizierende DNA-Segment gegenüber dem ursprünglich exponentiell vervielfaltigten Segment verkürzt, so daß es sich auch massenmäßig von den ursprünglich durch die Erst-Primer vervielfaltigten DNA-Segmenten abhebt.

Das Ablagern aller Primer (Hybridisierung oder englisch auch "annealing" genannt) geschieht in der Zyklusphase niedrigster Temperatur, etwa zwischen 50 und 60°C. In dieser Zyklusphase können entweder die in der Zyklusphase des Schmelzens abgetrennten Gegenstränge (unter Rekonstruktion der Doppelhelix) angelagert werden, oder die alten Erst-Primer der exponentiellen Vervielfältigung, oder der neu im Überschuß zugegebene Zweit-Primer. Es hängt dabei primär von der Konzentration ab, welche Arten von DNA-Stücken in welchen Prozentzahlen angelagert werden. In zweiter Linie spielt auch die Größe der anzulagernden DNA-Stücke eine Rolle, da sie die Diffusionsgeschwindigkeit und damit die Geschwindigkeit der Zuwanderung bestimmen. Die großen DNA-Gegeneinzelstränge sind hier per se im Nachteil. Drittens geht die Hybridisierungstemperatur in die Verhältnisse der Anlagerung ein, wenn auch nur sehr schwach. Höhere Temperaturen erhöhen die Diffusionsgeschwindigkeit, verringern aber die Bindungskräfte der Wasserstoffbrücken, die die Anlagerung bewirken.

Der Prozeß der Anlagerung selbst folgt einer Funktion $(1 - e^{-k(T,c)t})$, wobei t die Zeit bedeutet, und $k(T,c)$ die Reaktionskonstante, die wiederum von der Temperatur T und der Konzentration c abhängt. Durch Wahl insbesondere der Hybridisierungsgesamtzeit t (abhängig von der gewählten Hybridisierungstemperatur T) und der Konzentration c_{zweit} des Zweit-Primers gegenüber der Konzentration c_{erst} des Erst-Primers kann man es erreichen, daß die Hybridisierung der ausgewählten DNA-Stränge mit den neuen Zweit-Primern zu einem hohen Prozentsatz abgeschlossen werden kann, während die Hybridisierung der Gegenstränge mit den alten Erst-Primern (und die Hybridisierung mit den Gegensträngen) nur zu einem verschwindend kleinen Teil erfolgt. Dadurch werden in der Zyklusphase des Wiederaufbaus praktisch nur die neuen Zweit-Primer ergänzt. Wiederholt man jetzt den Zyklus Schmelzen/Hybridisierung/Wiederaufbau etwa 30mal, so hat der durch den Zweit-Primer erzeugten Einzelstrang eine Konzentration, die etwa 20- bis 25mal so hoch ist wie die der beiden durch den Erst-Primer erhaltenen Stränge.

Man kann dabei auch den Effekt ausnutzen, daß sich das Erst-Primerpaar während der exponentiellen Vervielfältigungsphase verbraucht. Wählt man die ursprüngliche Konzentration des Erst-Primerpaares nicht sehr hoch, so wird dieser Verbrauch merklich, doch vermindert man dabei die Effektivität der PCR sehr stark. Dieses Verfahren ist daher kaum zu empfehlen.

Man kann aber den Erst-Primer für die Amplifizierung des nicht erwünschten Gegenstranges durch einen weitere Idee dieser Erfindung weitgehend unwirksam machen. Dazu gibt man, zusammen mit dem Überschuß an neuem Zweit-Primer, auch einen Blockade-Primer im Überschuß hinzu. Dieser kann beispielsweise ein DNA-Gegenstrang des alten Erst-Primers sein. Es erfolgt dann ganz vorzugsweise eine Hybridisierung des Erst-Primers mit seinem Blockade-Primer, wodurch die Hybridisierung des unerwünschten DNA-Gegenstrangs wegen der extremen Verarmung an Erst-Primern weitgehend unterbleibt.

Dieser Blockade-Primer wird sich auch an den weiter zu vervielfältigten ausgewählten DNA-Einzelstrang anhybridisieren. Dieser Vorgang kann, je nach Art und Ausbildung

des Endes des Blockade-Primers, die Erneuerung des Gegenstranges durch die Polymerase bei Erreichen des Blockade-Primers stoppen. Normale DNA-Primer werden durch die Polymerase beim Wiederaufbau entfernt und vertrieben; aber besondere Arten von Primern, beispielsweise solche mit einer Amonsäurekette als Rückgrat, an denen die Basen befestigt sind, haften so fest, daß der Wiederaufbau hier stoppt. Dieser Effekt kann wiederum in positivem Sinn ausgenutzt werden, um den vervielfältigten Einzelstrang auf den wirklich effektiv massenspektrometrisch zu messenden Teil zu verkürzen.

Es ist eine weitere Idee der Erfindung, den Zweit-Primer mit einer gut ionisierenden Gruppe zu versehen. Als solche Gruppe kann eine quaternäre Ammoniumgruppe dienen. Diese Gruppe ist sehr leicht positiv zu ionisieren. Sie erhöht deshalb die MALDI-Ausbeute für diese Ionen und damit die Empfindlichkeit. Da sich diese Empfindlichkeitserhöhung wiederum nur auf den gewünschten Einzelstrang bezieht, wird die Unterdrückung von Doppelpicks hierdurch weiter unterstützt.

Besonders bevorzugte Ausführungsformen

Das Verfahren wird hier am Beispiel der PCR-Amplifikation von DNA gezeigt, soll aber nicht auf dieses Verfahren oder Material beschränkt sein. Es kann sich beispielsweise auch um eine enzymatische Vervielfältigung von RNA handeln, oder um eine der vielen anderen enzymatischen Amplifikationsmethoden für Genmaterial.

Das Verfahren der DNA-PCR wird insbesondere für das sogenannte "Fingerprinting" eingesetzt, bei dem sogenannte Mikrosatelliten variabler Länge oder STR (short tandem repeats) gemessen werden. Deren Länge läßt sich leicht über eine massenspektrometrische Molekulargewichtsbestimmung bestimmen. Als Primer werden Kopien aus beidseitig anschließenden DNA-Regionen geringer Variabilität benutzt.

In einem besonders bevorzugten Verfahren werden zunächst in üblicher Weise aus der ausgelösten DNA einer Bioprobe mit mindestens 10 bis höchstens 1000 Zellen (beispielsweise etwa 100 Zellen aus einer Haarwurzel) durch jeweilige Verdoppelung in 26 PCR-Zyklen etwa 600 Millionen bis 60 Milliarden DNA-Segmente gebildet, das entspricht etwa 10 bis 1000 Femtomol an DNA-Segmenten. Die Primer haben normalerweise Längen von etwa 20 Basen. Es werden zur späteren Stabilisierung während der MALDI-Ionisierung Diaza-Nukleotridiphosphate benutzt.

Nach diesen 26 Zyklen wird der Lösung direkt nach dem Schmelzen bei 90°C, in der sich die DNA möglichst noch bei hoher Temperatur (zwischen 90 und 70°C) im Einzelstrangzustand befindet, der Zweit-Primer zugegeben.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der Zweit-Primer nicht mit einem der Erst-Primer identisch. Sein Startpunkt ist um etwa 4 Basen verschoben und er ist auf etwa 10 Basen Länge verkürzt. Dadurch wird einerseits das durch ihn erzeugte Produkt um etwa 1000 atomare Masseneinheiten leichter (und dadurch im Massenspektrum deutlich erkennbar), und andererseits die Hybridisierungsgeschwindigkeit beträchtlich erhöht. Zusammen mit einem etwa 10-fachen Konzentrationsüberschuß über die Erst-Primer kann so erreicht werden, daß nach einer beschränkten Hybridisierungszeit 95 Prozent der DNA-Segmente mit dem Zweit-Primer und nur 5 Prozent mit dem Erst-Primer hybridisiert werden. Dadurch werden 95 Prozent der gewünschten Einzelstränge erzeugt, gemessen an den schon gebildeten DNA-Segmenten. In den nachfolgenden Zyklen findet durch die 5-prozentige exponentielle Erhöhung beider Stränge noch ein leichtes Wachstum beider Stränge statt, je-

desmal werden aber 95 Prozent Einzelstränge der erwünschten Art erzeugt.

Die Ionisierungswahrscheinlichkeit im MALDI-Prozeß kann dabei für den gewünschten Einzelstrang noch erhöht werden, indem dem Zweit-Primer eine chemische Gruppe mit einer positiven Ladung ("charge tag") angehängt wird, wie in PCT/GB 96/00476 beschrieben, beispielsweise eine quaternare Ammonium-Gruppe.

Der Zweit-Primer kann natürlich auch mit einem der beiden Erst-Primer identisch sein. Es entsteht dann immer noch ein Doppelpeak, aber der Peak des gewünschten Einzelstrangs ist beträchtlich höher. Der andere Peak erscheint nur noch als eine Art Ausläufer des Hauptpeaks.

Der leichte exponentielle Anstieg der Konzentration beider Einzelstränge kann dadurch wirksam unterdrückt werden, daß ein Blockade-Primer zugegeben wird, der einen Gegenstrang zu dem nicht mehr benötigten Erst-Primer bildet. Dieser im Überschuß zugegebene DNA-Strang hybridisiert mit dem Erst-Primer und blockiert ihn; er kann dann nicht mehr mit den vervielfältigten DNA-Segmenten hybridisieren. Dieser Blockade-Primer hybridisiert aber auch an das Ende derjenigen Einzelstränge an, die zur Herstellung der gewünschten Einzelstränge für die massenspektrometrische Analyse dienen. Wenn es sich um einen besonders fest haftenden Blockade-Primer handelt, kann dadurch der Wiederaufbau der gewünschten Einzelstränge am Beginn dieses Primers gestoppt werden. Ein solcher sehr fest haftender Blockade-Primer kann beispielsweise als Aminosäurekette als Rückgrat mit entsprechend angebauten Basen hergestellt werden. Dieser Blockade-Primer wird nicht mehr von der Polymerase entfernt und es findet auch keine Verbindung zwischen dem wiederaufgebauten DNA-Strang und dem Blockade-Primer statt. Die so für die massenspektrometrische Analyse erzeugten Einzelstränge sind also um diesen Blockade-Primer kürzer: ein erwünschter Effekt für die Massenspektrometrie, bei der die zu analysierenden DNA-Stücke ja so kurz wie möglich sein sollen. Die Länge des Blockade-Primers interessiert in diesem Zusammenhang nicht, sie ist genau bekannt.

Das beschriebene Verfahren kann natürlich vielfältig variiert werden. So kann – wie jedem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt – auch anderes Genmaterial (beispielsweise RNA) enzymatisch vervielfältigt und es können auch andere enzymatische Amplifikationsmethoden angewandt werden. Das hier wiedergegebene Prinzip läßt sich bei allen diesen Amplifikationsmethoden anwenden.

Patentansprüche

1. Verfahren für eine selektive, enzymatische Vervielfältigung von doppelsträngigem Genmaterial (nach der Art der PCR für DNA-Proben) für die massenspektrometrische Analyse, wobei die Selektivität durch Paare von Erst-Primern bestimmt wird, **dadurch gekennzeichnet**,
daß in einem ersten Schritt die durch Paare von Erst-Primern ausgewählten Abschnitte beider Stränge des Genmaterials enzymatisch exponentiell vervielfältigt werden,
daß in einem zweiten Schritt paarlose Zweit-Primer zugegeben werden, die jeweils nur einen Strang der zwei zueinandergehörigen DNA-Abschnitte hybridisieren, in einer Konzentration, die wesentlich über der der Erst-Primer liegt, so
daß im dritten Schritt bei der Fortführung der Amplifikations-Zyklen im wesentlichen nur noch eine lineare, einsträngige Vervielfältigung der durch die Zweit-Primer ausgewählten Einzelstränge stattfindet.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß für die Amplifikations-Zyklen mit dem Zweit-Primer die Hybridisierungsbedingungen (Temperatur, Zeit, Konzentration) so gewählt werden, daß bevorzugt nur die Zweit-Primer zur Hybridisierung gelangen.

3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Zweit-Primer mit einem der Erst-Primer eines Paares identisch ist.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Zweit-Primer mit einem der Erst-Primer teilidentisch, aber wesentlich kürzer ist, so daß die Geschwindigkeit der Hybridisierung mit diesem Zweit-Primer erhöht wird.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der Zweit-Primer nicht mit einem der Erst-Primer identisch ist, sondern durch Verschiebung des Startpunkt ins Innere der bisher erzeugten Genmaterial-Segmente einen kürzeren Gegenstrang erzeugt, der sich massenspektrometrisch gut von dem Doppelpeak der Genmaterial-Segmente des Erst-Primers unterscheidet.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß für die Amplifizierung modifizierte Nukleotidtriphosphate benutzt werden, wobei die Modifizierungen der Stabilisierung der Basen im späteren MALDI-Prozeß dienen, wie beispielsweise Diaza-Verbindungen.

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß zusätzlich zum Zweit-Primer auch ein Blockade-Primer zugegeben wird, der bevorzugt mit den unerwünschten Erst-Primern hybridisiert und diese von weiterer Teilnahme an den Amplifikationen ausschließt

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Blockade-Primer dazu benutzt wird, durch besonders feste Haftung bei der Hybridisierung an den linear zu vervielfältigenden Genmaterial-Segmenten diese zu verkürzen.